

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-238595

(43)Date of publication of application : 27. 08. 2002

(51)Int: CI.

C12P 21/02

C12N 15/09

G01N 33/53

G01N 33/68

(21)Application number : 2001-057514 (71)Applicant : DREAMBIOGEN CO LTD

(22)Date of filing : 02. 03. 2001 (72)Inventor : CHOI CHA YONG
KANG SANG HYEON
KANG TAEK JIN
WOO JI HYOUNG
LEE SANG KIL
CHOI SEONG WOO

(30)Priority

Priority 2001 200105949 Priority 07. 02. 2001 Priority KR
number : date : country :

(54) METHOD FOR CELL-FREE PROTEIN COMPLETE POST-TRANSLATIONAL MODIFICATION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for producing a protein necessary for completely post-translational modification having therapeutic, research and industrial values by a cell-free completely post-translational modified protein synthesis not by a cell culture method.

SOLUTION: This method for producing the completely post-translational modified protein is characterized in that, in a method for producing a completely post-translational modified protein, the method is passed through a coupled cell-free completely post-translational modified protein synthesis comprising (a) a process for adding a DNA or RNA having genetic information on the objective protein to a cell extract, (b) a process for adding a nucleic acid to the cell extract and (c) a process for adding endoplasmic reticulum (ER)/Golgi apparatus or endoplasmic reticulum/Golgi apparatus/plasma membrane or post-translational modified machinery such as other organelle besides them in an amount sufficient to stimulate the production of the completely post-translational modified protein to the extract.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision
of rejection][Kind of final disposal of application
other than the examiner's decision of

rejection or application converted
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998, 2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-238595

(P2002-238595A)

(43) 公開日 平成14年8月27日 (2002. 8. 27)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

ターミナル* (参考)

C 1 2 P 21/02

C 1 2 P 21/02

C 2 G 0 4 5

C 1 2 N 15/09

G 0 1 N 33/53

D 4 B 0 2 4

G 0 1 N 33/53

33/68

4 B 0 6 4

33/68

C 1 2 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号

特願2001-57514(P2001-57514)

(22) 出願日

平成13年3月2日 (2001. 3. 2)

(31) 優先権主張番号

2 0 0 1 - 0 0 0 5 9 4 9

(32) 優先日

平成13年2月7日 (2001. 2. 7)

(33) 優先権主張国

韓国 (K R)

(71) 出願人

501075741

ドリームバイオジェン株式会社

大韓民国、ソウル、カンナング、サムサンードン、141、スンウォン ビルディング、14F

(72) 発明者

チャ、ヨン、チョイ

大韓民国、ソウル、ガナクグ、ボンチョン 3ードン、ガナク ヒュンダイ アパート、124-1201

(74) 代理人

100106596

弁理士 河備 健二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 無細胞蛋白質の完全翻訳後修飾方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 細胞培養法ではなく無細胞完全翻訳後修飾蛋白質生産法で、治療用、研究用及び産業用価値をもつ翻訳後修飾の必要な蛋白質を生産する方法の提供。

【解決手段】 完全翻訳後修飾蛋白質を生産するための方法において、(a) 目的蛋白質の遺伝情報を持つDNA、又はRNAを細胞抽出物に添加する工程、(b) 核酸を上記抽出物に添加する工程、及び(c) 完全翻訳後修飾蛋白質の製造を刺激するのに十分な量の、小胞体 (ER) / ゴルジ体又は小胞体 / ゴルジ体 / 細胞膜、或いはこれらに加えて他の細胞小器官のような翻訳後修飾マシーナリーを上記抽出物に添加する工程からなる結合無細胞完全翻訳後修飾蛋白質合成法、を経由することを特徴とする完全翻訳後修飾蛋白質の生産方法により提供。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 完全翻訳後修飾蛋白質 (completely post-translational modified protein) を生産するための方法において、(a) 目的蛋白質の遺伝情報を持つDNA (DNA template) を細胞抽出物に添加する工程、(b) 核酸 (リボヌクレオチド三リン酸塩; ribonucleotide triphosphate) を上記抽出物に添加する工程、および(c) 完全翻訳後修飾蛋白質の製造を刺激するのに十分な量の、小胞体 (ER) / ゴルジ体 (Golgi apparatus) 又は小胞体 / ゴルジ体 / 細胞膜 (plasma membrane)、あるいはこれらに加えて他の細胞小器官 (organelles) のような翻訳後修飾マシーナリー (machinery) を上記抽出物に添加する工程からなる結合無細胞完全翻訳後修飾蛋白質合成法 (coupled cell-free completely post-translational modified protein synthesis)、または(a') 目的蛋白質の遺伝情報を持つRNAを細胞抽出物に添加する工程、および(b') 完全翻訳後修飾蛋白質の製造を刺激するのに十分な量の、小胞体 (ER) / ゴルジ体又は小胞体 / ゴルジ体 / 細胞膜、あるいはこれらに加えて他の細胞小器官のような翻訳後修飾マシーナリー (machinery) を上記抽出物に添加する工程からなる非結合無細胞完全翻訳後修飾蛋白質合成法 (uncoupled cell-free completely post-translational modified protein synthesis) を経由することを特徴とする完全翻訳後修飾蛋白質の生産方法。

【請求項2】 上記無細胞蛋白質合成法における細胞抽出物を製造するため細胞源 (cell source) と上記翻訳後修飾マシーナリーの細胞源が、同一であるか又は異なることを特徴とする請求項1記載の生産方法。

【請求項3】 上記完全翻訳後修飾が糖鎖付加反応であることを特徴とする請求項1記載の生産方法。

【請求項4】 上記蛋白質がEPOであることを特徴とする請求項1記載の生産方法。

【請求項5】 上記翻訳後修飾マシーナリーが、組織細胞及び/又は培養した株細胞 (cultured cell lines) から抽出されたものであることを特徴とする請求項1記載の生産方法。

【請求項6】 糖鎖付加マシーナリーを含有しても良い上記翻訳後修飾マシーナリーが、糖鎖付加反応酵素の発現レベルの向上及び/又は糖ヌクレオチド貯蔵物 (pools of sugar nucleotides) の濃縮のために、遺伝子工学的に培養された株細胞から製造されることを特徴とする請求項5記載の生産方法。

【請求項7】 上記生産した糖蛋白質が、糖鎖構造変更関連酵素を用いた糖付加反応及び/又は糖切断反応及び/又は糖置換反応により追加的に修飾されることを特徴とする請求項4記載の生産方法。

【請求項8】 請求項1~8のいずれか1項に記載の方法で生産された翻訳後修飾蛋白質を含有することを特徴とする遺伝子機能を診断するためのキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、無細胞蛋白質生産 (cell-free protein synthesis) と無細胞完全翻訳後修飾 (cell-free completely post-translational modification) を組み合わせた完全翻訳後修飾蛋白質 (completely post-translational modified protein) の生産方法に関する。また、本発明は、治療用、研究用および産業用価値をもつ翻訳後修飾の必要な蛋白質を、細胞培養法 (cell culture method) ではなく、無細胞完全翻訳後修飾蛋白質生産法 (cell-free completely post-translational modified protein synthesis) で生産する方法に関する。さらに詳しく説明すると、蛋白質生産のマシーナリー (machinery) を含む細胞抽出物と完全翻訳後修飾のマシーナリーを含む細胞の膜成分抽出物とからなる無細胞完全翻訳後修飾蛋白質生産法を利用して有用な蛋白質が生産される。

【0002】 医薬品などで使用される多くの蛋白質は、活性のために、糖鎖付加 (glycosylation)、リン酸化 (phosphorylation)、アミド化 (amidation) などの翻訳後修飾を受ける。その上、動物細胞から分泌される多くの蛋白質も、このような翻訳後修飾を受けた蛋白質である。多くの蛋白質は、小胞体 (endoplasmic reticulum (ER))、ゴルジ体 (Golgi apparatus) および細胞膜で構成された分泌経路 (secretory process) を経る間に、糖鎖付加をはじめとする翻訳後修飾されたものと成る。蛋白質の翻訳後修飾には、蛋白質にリン酸が付くリン酸化、蛋白質の鎖の末端にアミド基が導入されるアミド化および蛋白質に炭水化物からなる糖鎖が付く糖鎖付加反応などがある。この中で、一番多くの酵素が関与する複雑な反応が、糖鎖付加反応である。そのため、糖蛋白質は、全ての生物の広範に分布する生物学的化合物の中で、最も多様な化合物である。これらは、細胞外基質や細胞間にある溶液内と同じように、可溶性であり膜結合性でもある細胞内で起こり、これらの化合物にさまざまな機能を与える。

【0003】 糖鎖付加蛋白質は、蛋白質を構成するアミ

ノ酸の一種のアスパラギン(Asn)の側鎖に糖鎖が付く(“アスパラギン-結合型”(asparagine-linked)、または“N-結合型”(N-linked))糖鎖付加と、セリンやスレオニンの側鎖に糖鎖が付く(“O-結合型”(O-linked))糖鎖付加に大別される。普通、糖蛋白質は、N-結合型糖鎖構造だけを持っていたり、O-結合型糖鎖構造だけを持っていたりまたは両方とも持っている。N-結合型糖鎖構造は、高マンノース形(high-mannose type)、混合形(hybrid-type)および複合形(complex-type)に分けられる。糖蛋白の糖質のユニットは、単糖または二糖や、20種もの単糖残基から構成される分枝したオリゴ糖に分類できるが、サイズや構造において、かなりのバリエーションを呈する。

【0004】要約すると、N-結合型糖鎖形成は、脂質が結合したオリゴ糖部分の合成と、その小胞体(ER)内の発生期ポリペプチド鎖への一体転位(transferen bloc)とともに始まる。結合は、Asn、一般的にはAsn-X-Ser/Theのトリペプチド認識シーケンスを通して起こる。ここで、Xは自然に発生するアミノ酸のうちの任意のアミノ酸である。一連の切断反応(trimming reaction)は、ER内にあるエキソグリコシダーゼ(exoglycosidase)によって触媒される。哺乳類の細胞によるN-結合型オリゴ糖の次の処理は、ゴルジ体の区画内で続けられる。そこでは、エキソグリコシダーゼやグリコシルトランスフェラーゼ(glycosyltransferase)のシーケンスに触媒された反応が、高マンノース、混合型または複合型のオリゴ糖構造を生成する。

【0005】このような、糖蛋白質を含む、翻訳後修飾された生物学的に活性な蛋白質を、生物学的生産方法で製造するためには、糖鎖付加反応を含む翻訳後修飾が可能な真核生物細胞の培養が必要である。しかし、真核生物細胞培養で有用な蛋白質を生産する場合には、培地費用、運転費用、設備費用など、コストが莫大となる。また、この方法は大変時間がかかるため、工程を単純化し、時間を節約するために、多数の無細胞蛋白質生産法が開発された。

【0006】無細胞蛋白質生産法は、宿主細胞(host cell)への毒性の問題のために生体内(in vivo)で合成できない蛋白質を、試験管内(in vitro)で遺伝子発現させる研究のための実験の手段として利用されてきた。さらに、20種の天然アミノ酸に加えて、さまざまな合成アミノ酸を、特別に意図された目的のために、この方法で効率的に蛋白質の骨格内に組み込むことができる(Noren C. J. et al., Science 244:182-188(1989))。さらに、無細胞蛋白質生産法は、最近、商業的に重要な組換え型蛋白質製造の代替として再評価されている。それは、主に、最近の新しい反応器の開発や、反応実行条件の最適化による((Kim, D. M. et al., Eur. J. Biochem. 239:881-886(1996); Kigawa, T. et al., FEBS Lett. 442:15-19(1999))。そのため、無細胞蛋白質生産法の開発は、次世代に入っているといえる。つまり、商業規模での活性蛋白質の生産である。

【0007】従って、これらの無細胞蛋白質生産法に翻訳同時修飾と初期段階の翻訳後修飾に関連する細胞小器官(organelles)を加えることにより、翻訳同時修飾蛋白質(co-translationally modified protein)と、初期段階の翻訳後修飾蛋白質(initial post-translationally modified protein)とを生産するためのいくつかの方法が開発された。ところで、初期段階の翻訳後修飾には蛋白質の生産と同時に起こる機構もあるから、このような機構を区分して、翻訳同時修飾(co-translational modification)と名称するのが正しいが、本発明ではこれらもすべて“翻訳後修飾”という。無細胞蛋白質生産法による初期段階の翻訳後修飾の代表例として、米国特許第6,103,489号は、翻訳後修飾蛋白質の無細胞アクセシシステムが、粗面ミクロソーム(rough microsome)と真核細胞の無細胞翻訳システムとを結合することによって構築されることを開示している。もう1つの方法では、ERのような翻訳成分や翻訳後修飾成分を含んだ抽出物が単一原料からの一段階抽出により調製された(Hiroshi, T., et al., J. Bioeng. 5:508-513(2000))。

【0008】細胞内では、適切な処理のため、多くの蛋白質の生物学的合成には、ERと呼ばれる細胞小器官の膜を透過する同時翻訳的な翻訳が必要である。無細胞システムでは、ERの代わりに、ミクロソームの膜が利用される。これは、それらは遠心分離できるERの膜を高いパーセンテージで含み、ERと等価のものだからである。これらの再構成された高等真核生物の蛋白質翻訳の評価や初期段階の翻訳後修飾蛋白質のためのアクセシシステムは、膜透過反応(転位反応:translocational machinery)装置を特殊化させ、また、膜蛋白のトポロジーの決定やN-結合型中心糖鎖付加反応(core glycosylation)に積極的に使用されてきた。しかし、これらでは完全な糖鎖付加などを含む完全な翻訳後修飾蛋白質の生産は不可能である。つまり、このような方法により生産された蛋白質は、完全な構造を持っていないので、蛋白質の効能および特性の研究に利用することができないだけ

でなく、治療用蛋白質への応用にも適合しない。不完全な形態の糖鎖構造を持つ糖蛋白質や翻訳後修飾が欠乏した蛋白質は、生物学的活性が無いまたは大変低いので、治療目的で使用するには適合しない。このような不完全な形態の翻訳後修飾を持つ蛋白質だけを生産できる従来の無細胞蛋白質生産法は、完全な構造の蛋白質を生産できないので、糖鎖付加反応などの翻訳後修飾の関連研究や、遺伝子の機能研究に使用するには不十分である。

【0009】一方、ヒューマングノムプロジェクト (Human Genome Project) から多くの遺伝情報が得られている。近い将来には、完全なヒトの遺伝子地図 (genome map) が完成するであろう。現在、我々は、新しい遺伝子を探す段階から、それらの遺伝子や、それがエンコードする蛋白質の機能を探求する段階に研究の目的が変わってきている。この目的のために、コンピュータプログラムを利用する遺伝子序列分析法でその遺伝子から生成された蛋白質の機能を予測する生物情報学 (bioinformatics) が利用されている。この方法によって予測された蛋白質の構造と遺伝子のシーケンスから、その蛋白質の機能を明らかにすることができる。得られた蛋白質の機能は、予測されたものであるため、実際と異なる可能性が大変高く、十分に満足できる方法ではない。そのため、さらに正確で完璧な方法が必要だが、その方法とは直接その蛋白質を生産して、実験を通じて機能を調査することである。この時生産される蛋白質は、翻訳後修飾がよく遂行されて完全な形態と構造を持っていないなければならない。このような蛋白質を生産するためには、上述したように、遺伝子を高等細胞から発現することが必要である。これには大変多くの時間と労働が必要であるが、プロセスを簡略化したり時間を節約するために、無細胞蛋白質生産法が利用できる。現在までに、完全に翻訳後修飾ができる無細胞蛋白質生産法は開発されていない。そのため、完全な翻訳後修飾が行われた蛋白質を生産できる無細胞蛋白質生産法を開発する必要があった。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、無細胞蛋白質生産法が完全な翻訳後修飾蛋白質を生産できないという、従来技術の問題点を解決するために、より進歩した無細胞蛋白質生産法によって、特に、無細胞蛋白質生産法と無細胞完全翻訳後修飾蛋白質生産法の組み合わせにより、完全に翻訳後修飾された蛋白質を生産する方法を提供することにある。さらには、本発明の目的は、上述した方法で翻訳後修飾された蛋白質の発現および翻訳後修飾キット (kit) などを提供することにある。

【0011】本発明の無細胞蛋白質生産法は、蛋白質の機能分析や治療に重要な蛋白質の大量生産のために用いられる、完全翻訳後修飾蛋白質を合成するための有用な

手段になるばかりでなく、蛋白質の機能および修飾後翻訳のメカニズムを解明するためのモデルシステムになりうるものと思われる。

【0012】

【課題を解決するための手段】このような目的達成のために、本発明は、次に示す結合無細胞完全翻訳後修飾蛋白質合成法 (coupled cell-free completely post-translational modified protein synthesis) 又は非結合無細胞完全翻訳後修飾蛋白質合成法 (uncoupled cell-free completely post-translational modified protein synthesis) を経由することを特徴とする、完全翻訳後修飾蛋白質を生産する方法を提供する。すなわち、本発明の結合無細胞完全翻訳後修飾蛋白質合成法は、以下の (a) ~ (c) 工程からなる；

(a) 目的蛋白質の遺伝情報を持つ DNA (DNA template) を細胞抽出物に添加する工程、(b) 核酸 (リボヌクレオチド三リン酸塩；ribonucleotidetriphosphates) を上記抽出物に添加する工程、および (c) 完全翻訳後修飾蛋白質の製造を刺激するのに十分な量の、小胞体 (ER) / ゴルジ体 (Golgi apparatus) 又は小胞体 / ゴルジ体 / 細胞膜 (plasma membrane)、あるいはこれらに加えて他の細胞小器官 (organelles) のような翻訳後修飾マシーナリー (machinery) を上記抽出物に添加する工程。さらに、本発明の非結合無細胞完全翻訳後修飾蛋白質合成法は、以下の (a') ~ (b') 工程からなる；

(a') 目的蛋白質の遺伝情報を持つ RNA を細胞抽出物に添加する工程、および (b') 完全翻訳後修飾蛋白質の製造を刺激するのに十分な量の、小胞体 (ER) / ゴルジ体又は小胞体 / ゴルジ体 / 細胞膜、あるいはこれらに加えて他の細胞小器官のような翻訳後修飾マシーナリー (machinery) を上記抽出物に添加する工程。

【0013】幾つかの酵素を必要とする最も複雑な翻訳後修飾プロセスが糖鎖付加反応である。そのため、糖鎖付加反応がよく起こると、これは大多数のほかの翻訳後修飾も可能なことを意味する。

【0014】細胞内の蛋白質の糖鎖付加反応を調べてみると、大部分の真核細胞で起こる糖鎖付加反応は、一般に小胞体 (ER) 内で起こる。つまり、酵母菌、昆虫、植物および哺乳類の細胞が、ER 内で、N-結合型オリゴ糖の機能を分け与えている。つまり、小胞体だけを通じた糖蛋白質の糖鎖構造は、ほとんど同じであるけれども、小胞体での初期糖鎖付加反応だけから成る糖蛋白質は、最後の目的糖蛋白質の特性をあまり反映できないし、このような初期糖鎖付加反応だけでは生産される糖

蛋白質に治療剤の効能を付与できない。

【0015】中途の糖蛋白の製造は、完全な翻訳後修飾を経ておらず、ゴルジ体のような後期糖鎖付加反応マシーナリーの欠如によって起こりうる。別の言葉でいえば、異なったタイプの細胞によるオリゴ糖の処理は、ゴルジ体によって異なるであろう。哺乳類細胞におけるO-型糖鎖付加反応(O-glycosylation)の初期段階は、セリンまたはスレオニンへの、N-型アセチルガラクトサミンの共有的な結合である。どんなO-型糖鎖付加反応のシーケンスも、N-型糖鎖付加反応(N-glycosylation)に必要とされる、Asn-X-Ser/Thrの鋳型(template)と類似していない。N-型糖鎖付加反応とのさらなる相違として、前もって形成されない、脂質共役オリゴ糖前駆体が初期の哺乳類O-型糖鎖付加反応に含まれている。糖のヌクレオチドは、O-結合型プロセスにおける、最初のそしてその後起こる全ての工程の基質となる。続いてセリンまたはスレオニンへのN-型アセチルガラクトサミンの共有的な結合が起こり、いくつかの異なる処理の経路が、ゴルジ体における哺乳類のO-結合型オリゴ糖に可能である。糖蛋白のオリゴ糖の構造は、人間の治療用途に決定的な性質、血漿クリアランス度、抗原性、免疫原性、比活性(specific activity)、溶解度、熱による非活性化に対する抵抗およびプロテアーゼの攻撃への抵抗に、重要な影響を及ぼす。ゆえに、糖蛋白の大量生産に適用する無細胞蛋白質生産法のために、および、安定性、形態、蛋白質と糖鎖形成反応の機構の関係を理解するための蛋白質の糖鎖付加反応の役割の急速な洞察のために、蛋白質が完全に翻訳後修飾されるような、能率的な完全翻訳後修飾無細胞蛋白質生産法が開発される必要があった。

【0016】本発明は、完全な構造の糖鎖が付加された糖蛋白を生産するために、適切な無細胞蛋白質生産法を構築し、これと、細胞から分離した翻訳後修飾関連細胞内マシーナリーを利用した、無細胞糖鎖付加反応(in vitro glycosylation)の適切な組み合わせを目的とする。このような概念の無細胞翻訳後修飾蛋白質生産法は、今までに報告されたことがない、新しい方法である。これは、特に翻訳後修飾が必要な蛋白質の大量生産に大変好適である。また、このような方法は、糖鎖付加反応以外の、翻訳後修飾が必要な蛋白質の生産にも、直接応用することができる。

【0017】

【発明の実施の形態】原核細胞(prokaryotes)は、翻訳後修飾が欠乏しているから、本発明の無細胞翻訳後修飾に利用される無細胞蛋白質生産系は、真核細胞由来の無細胞蛋白質生産系でなければならない。今まで、菌類、哺乳類細胞(例;網状赤血球、内皮細胞およびリンパ球)を含むさまざまな真核生物可溶化液(蛋白質合成マシーナリー)、不死化株細胞(例;ガン株細胞等)および植物細胞(コムギ胚芽または胚細胞など)の原料を利用してきた。そして、効率的な真核細胞の転写-翻訳結合無細胞蛋白質生産法(coupled cell-free protein synthesis; coupled transcription/translation system)がバクテリオファージRNAポリメラーゼとウサギ網状赤血球可溶化液(RRL)を用いて開発された(米国特許第5,324,637号)。このように転写と翻訳が連続的に結合された無細胞蛋白質生産法を“転写-翻訳結合無細胞蛋白質生産法”という一方、転写と翻訳が別個の反応に区分されて起こる場合、つまり転写反応でDNAからmRNAを製造し、このmRNAを分離して、別個の翻訳反応でmRNAから蛋白質を生産する無細胞蛋白質生産法を“転写-翻訳非結合無細胞蛋白質生産法”(uncoupled cell-free protein synthesis; cell-free translation system)という。

【0018】上述したように、小胞体だけの添加は、完全に翻訳後修飾された蛋白質を形成できない。これはゴルジ体のような後期糖鎖付加反応(terminal glycosylation)をはじめとする後期翻訳後修飾に関連するマシーナリーの欠乏のためである。無細胞蛋白質生産反応混合物に、信号識別粒子(signal recognition particle)、ER、ゴルジ体、原形質膜等を含む翻訳後修飾マシーナリーを添加すると、完全翻訳後修飾蛋白質の生産が活性化される。完全な培養混合物(無細胞蛋白質生産と翻訳後修飾マシーナリーの複数の成分を含む)は、完全翻訳後修飾蛋白質を与える。翻訳後修飾過程はインビトロで忠実に再現しうる。本発明に記載した結果は、治療用の蛋白質のインビボ生産の代替としての無細胞蛋白質生産の可能性を開き、無細胞蛋白質生産法の理解を深めるものである。

【0019】無細胞蛋白質生産のための細胞抽出物製造用細胞と翻訳後修飾のための細胞内膜成分抽出物製造用細胞は、同じでも異なってもかまわない。同じ細胞を使用する場合にも、蛋白質生産用抽出物と翻訳後修飾用細胞内マシーナリーを別々に準備しても一緒に使用してもよい。

【0020】翻訳後修飾マシーナリーは、組織細胞や培養した株細胞(cultured cell lines)から製造することができる。糖鎖付加反応の場合、糖鎖付加反応関連酵素の発現を増進させるためや、及び/又は糖鎖付与反応で糖供与者(sugar-donor)の役割をする糖-核酸(sugar-nucleotides)複合体の量を増加させるためには、遺伝子工学技術者にとって細胞源(cell source)の方が有利である。このような遺伝子操作は、本発明が属する分野で通常の知識を持つ者(当業者)が容易に実

施できるので、詳しい説明は省略する。

【0021】無細胞蛋白質生産法における細胞抽出物を得る例としては、ヌクレアーゼ処理されたウサギ由来の赤血球破砕物 (rabbit reticulocyte lysate; RRL) の詳しい製造方法が実施例1に記載されている。また、糖鎖付加反応を含む翻訳後修飾に関連されたいろいろな細胞内マシーナリーを分離するために、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (Chinese hamster ovary cell; CHO cell) から細胞初期破砕物 (crude homogenate) を製造する詳しい製造方法が実施例2に記載されている。さらに、上記細胞初期破砕物から信号認識因子を含有する小胞体 (ER)、ゴルジ体、さらには細胞膜を分離する方法は、実施例3、実施例4および実施例5に各々記載されている。

【0022】場合によって、本発明の転写-翻訳結合無細胞蛋白質生産法および転写-翻訳非結合無細胞蛋白質生産法で生産された糖蛋白質は、糖転移酵素 (glycosyltransferase)、糖切断酵素 (glycosidase) および糖置換酵素 (transglycosidase) などの糖鎖構造変更関連酵素によって酵素的糖付加反応、糖切断反応、糖置換反応などを経て変形されることができる。つまり、新しい糖の添加や除去が可能であるので、一般的な糖鎖構造で発見されない糖の導入や、新しい糖鎖構造合成が可能である。そのため、新しい糖蛋白質の開発も可能である。例として、糖鎖付与反応液自体、または、これから分離したEPOは、糖置換酵素のひとつのトランス-シリアダーゼによって糖鎖末端にシアル酸をさらに付加することができるし、糖鎖末端にシアル酸の付加が増加するほど、一般的に糖蛋白質の薬効が増加する。

【0023】本発明は、医薬用、産業用及び研究用蛋白質の生産への応用が可能である。つまり成長ホルモン、類、顆粒球コロニー刺激因子、インターロイキン、インターフェロン、トロンボポエチン (血小板産生因子; thrombopoietin)、組織プラスミノゲンアクチベーター (tissue plasminogen activator)、ヒト化モノクローナル抗体 (humanized monoclonal antibody) などの蛋白質がすべて含まれる。また、本発明は、翻訳後修飾された蛋白質の生産自体だけでなく、最近新しく明かされた多くの遺伝子の機能の究明のための、完全な形態の蛋白質発現の研究手段および糖鎖付加反応などを含む翻訳後修飾に対する研究手段にも使用が可能である。また本発明は、上述した方法で生産された翻訳後修飾蛋白質を含む蛋白質の発現および翻訳後修飾キットなどで使用することができる。本発明の技術を利用した蛋白質の発現および翻訳後修飾キットを利用すると、時間、労働、費用を減らすことができる。特に膨大な量の遺伝子の機能を調査するためには、時間を短縮で

きることが大変重要である。

【0024】本発明の一つの実施態様では、EPOが完全翻訳後修飾蛋白質合成法により生産される。しかし、EPOは、ただ応用可能な治療用蛋白質のひとつの実例として提示され、本発明がこれら特定の実施例に限定されることはないし、本発明の分野における当業者によって、さまざまな変形が可能であることは理解されるであろう。また実施例には翻訳後修飾の一例にEPOの糖鎖付加反応だけを提示しているが、これは他の全ての翻訳後修飾反応の代表である。それゆえ、本発明は他の翻訳後修飾をすべて含むものである。

【0025】EPOは、慢性腎臓疾患をはじめとする各種疾患に聯関された貧血症を治療するために現在多く使用される治療用糖蛋白質である。EPOは、哺乳動物および鳥類の赤血球の生育に主要な調節物質である。特に、この糖蛋白質ホルモンは、骨髄、脾臓および胎児の肝で、赤血球幹細胞が早く生長することを促進したり、以後循環系を循環する赤血球の最終分化に必要である。現在、治療用EPOは動物細胞培養で生産されている。

【0026】翻訳後修飾が導入された転写-翻訳結合無細胞翻訳後修飾蛋白質生産法によるEPOの生産は、実施例6に詳しく記載されている。また、翻訳後修飾が導入された転写-翻訳非結合無細胞翻訳後修飾蛋白質生産法によるEPOの生産は、実施例7に詳しく記載されている。さらに、翻訳後修飾が導入された無細胞翻訳後修飾蛋白質生産法と酵素的 (インビトロ) 糖付加反応を結合した方法によるEPOの生産は、実施例8に詳しく記載されている。

【0027】

【実施例】以下、本発明で開発された詳しい内容を次の実施例に説明する。しかし、本発明は以下の例だけに限定されていないし、その変形も含む。

【0028】実施例1

ヌクレアーゼ処理されたウサギ由来の赤血球破砕物の製造

新しい周辺飼育環境と飼料に適応するように約2週間飼育したウサギに、3日間、貧血誘発剤の1.25% (w/v) アセチルフェニルヒドラジン (APH)、4-5 mlをえりくびに注射した。1.25% (w/v) のAPHの貯蔵水溶液は、加温攪拌機で準備され、その後-20℃で保管された。ウサギは通常としてスケジュールの8日目に採血された (最後のAPH注射の5日後ウサギから採血した)。0.5 mlのヒプノルム (Hypnorm) が大腿筋に注射された。ヒプノルムが一旦効果を示し、ウサギが麻酔にかかったら、片方の耳の縁が、大辺縁静脈 (the big marginal vein) が暴露するように、毛が剃られ、ヘパリンを2,000単位含むネムブタル (Nembutal) またはサガタル (Sagatal) を、2-2.5 ml、注射した。動物が完全に無意識になったとき、ウサギの胸部

を95% (v/v) エタノールでひたした後、毛を除去した。胸部 (rib cage) が十分に暴露された時、下部中央線から頭部中央線へ切開し、約1インチ側面に筋肉と骨の三角形フラップができた。このフラップは開かれるように折り畳まれ、心臓そのものまたは心臓からでている大動脈が切開された。胸の空間が急速に血液で満たされ、この血液を30-50 ml、3インチのシリコンラバーまたはタイゴン (Tygon) チューブのついた注射器で、ヘパリンなどの血液凝固防止剤があらかじめ少量添加された冷たい採血容器に移した。ウサギ一匹から平均100 mlの血液が得られた。

【0029】得られた血液から毛などの不純物を除去するために、チーズクロスまたはナイロン布で血液を濾過した。これを2,000 rpmで10分間遠心分離して赤血球を回収した。回収された赤血球を5 mMのブドウ糖が含まれている緩衝液 (5.5 mMの酢酸カリウム、25 mMのトリス-酢酸、137 mMの塩化ナトリウム、0.28 mMの $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、1 mMのエチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、1 mMのジチオトレイトール (DTT)) で再懸濁させた。これをまた2,000 rpmで10分間遠心分離した後上清を除去した。この過程をもう3回反復して細胞を洗浄した。つまり、全部で4回の低速回転である。最後の洗浄後、計測された体積の生理食塩水中で再懸濁し、全体の体積を計測することによって、細胞の体積が決定された。最後の遠心分離の後、細胞の体積 (濃縮細胞体積として) の1.5倍の冷たい蒸留水で再懸濁させた。溶液を完全に混合して細胞を破碎し、もう一度溶液を10,000 rpm (約15,000 g)、2°Cで20分間遠心分離した。上清をナイロン布 (53 μm , Nitex材質) を利用して濾過して、どんなにかわ状間質の塊も可溶化液に入るのを防いだ。それは蛋白質合成の抑制物質を含むからである。

【0030】この時得られた赤血球破碎物は、蛋白質合成マシーナリーを多く持っており、これを“赤血球破碎物”または“細胞抽出物”という。このように得られた赤血球破碎物には多量のmRNAが存在する。このmRNAの活性を除去するためにmRNAの活性を選択的に除去するスクリアーゼで赤血球破碎物を処理した。400 μl の溶液あたり1 mlのヘミン8 μl 、10 mg/mlのクレアチンキナーゼ4 μl 、125 mMの塩化カリウム3.2 μl 、および15,000 units/mlのマイクロコッカススクリアーゼ16 μl を添加してよく混合した後、2.0°Cで30分間反応した。マイクロコッカススクリアーゼの反応はカルシウムイオンを必要とするため、反応液にカルシウムイオンを選択的にキレートできる500 mMのエチレンジアミン四酢酸 (EGTA) 8.8 μl を添加して反応を停止した。この溶液は約85 μl の適当な一定分量に分けられた。この溶液は可能

な限り急速に冷やすため、液体窒素内で凍結された。この方法で貯蔵された溶液は、少なくとも3年間、どんな活動も失わない。-70°C冷凍庫で保管された貯蔵物は、少なくとも数ヶ月の間良好なようであった。

【0031】実施例2

チャイニーズハムスター卵巣細胞からの天然ホモジネート (細胞初期破碎物) の製造

翻訳後修飾マシーナリーの分離のために、まず、細胞内膜成分を多量に含んでいる細胞初期破碎物を製造する。本実施例で使用した細胞はCHO細胞である。30個の細胞培養プレートに、CHO細胞を培養プレートあたり4-6 $\times 10^7$ の細胞数になるように、培養温度を34°C、気相を95%空気-5%炭酸ガスとして培養した。培養後の細胞は、蛋白質分解酵素のトリプシンの処理で培養プレートから外す。培養プレートから培養液を除去した後、培養プレートに付いている細胞を10 mlのトリス緩衝液 (5.5 mMの酢酸カリウム、25 mMのトリス-酢酸、137 mMの塩化ナトリウム、0.28 mMの $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、1 mMのエチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、1 mMのDTTおよび0.5 mMのフェニルメチルスルフォニルフラウ化物 (PMSF) (pH 7.4)) で洗浄した。以後0.05%のトリプシンと0.02%のEDTAが含まれているトリス緩衝液を、各培養プレートあたり5 ml加えた後、常温で5分間放置して酵素反応を誘導した。酵素反応後、冷たい培地を、各培養プレートあたり2 ml添加して、各培養プレートから酵素反応液を集めて、4°C、600 gで5分間遠心分離した。遠心分離後、細胞沈殿物からトリプシンが完全に除去されるように、50-100 mlのトリス緩衝液で3回洗浄した。最後の遠心分離後、細胞沈殿物の体積を測定し、細胞沈殿物を5倍の破碎緩衝液 (250 mMのスクロース、10 mMのトリス-酢酸、1 mMのEDTA、1 mMのDTT、および0.5 mMのPMSF (pH 7.4)) で再懸濁させた。きっちりと合わせられた15 mlのドゥンスホモジナイザー (Dounce homogenizer, Wheaton Co., Millville NJ) を30回振ることによって、細胞の懸濁液から天然ホモジネートが製造された。得られた天然ホモジネートは、すぐに使用できるが、さらに都合が良いように、液体窒素で凍結され、後の細胞成分分画のために、-80°Cで貯蔵された。

【0032】実施例3

天然ホモジネートからの内部原形質の細網を含む信号識別粒子の製造

〈細胞初期破碎物からの信号認識粒子と結合している小胞体の分離〉実施例2の、冷凍保管された細胞初期破碎物を、30°Cで速く解凍した後、氷に置いた。この細胞初期破碎物を4°C、5,000 gで15分間遠心分離した。遠心分離後上清を注意して回収し、4倍の細胞破碎

緩衝液で稀釈した後、ミトコンドリアを除去するために、4℃、8,500gで5分間遠心分離した。遠心分離後、上清からスクロースの密度差超遠心分離で小胞体を分離した。超遠心分離の際、超遠心分離用試料を準備するために、容器の下から順に、10mMのトリス酢酸(pH7.4)を含む2.0Mのスクロース溶液、10mMのトリス-酢酸(pH7.4)を含む1.5Mのスクロース溶液、10mMのトリス-酢酸(pH7.4)を含む1.3Mのスクロース溶液を3:4:4の体積比(v/v)で満たした。このスクロース溶液の上を、先に遠心分離で準備された小胞体を含む上清で満たした。この試料を4℃、90,000g(Beckman社SW28ローター(rotor)使用時23,000rpm)で150分間超遠心分離した。超遠心分離後、1.3M-1.5Mのスクロース溶液の界面と、1.5M-2.0Mのスクロース溶液の界面から、小胞体部分を得られた。回収した小胞体部分を3倍の稀釈緩衝液(55mMのトリス-酢酸、5mMの酢酸マグネシウム(pH7.0))で稀釈した後、4℃、90,000gで、45分間、もう一度超遠心分離した。超遠心分離後、得た小胞体の沈殿物を、50-100μlの貯蔵緩衝液(5mMのトリエタノールアミン、2mMのDTTおよび250mMのスクロース)に溶解させた。

【0033】貯蔵緩衝液に溶解した小胞体を、ブドウ球菌ヌクリアーゼ(EC 3.1.31.1)で処理して、内在RNAを除去した。つまり、0.1mlの小胞体溶液あたり12.5mMの塩化カルシウム溶液8μl、および60unitのブドウ球菌ヌクリアーゼを添加して20℃で30分間反応することによって処理した。30分後、0.5MのEGTA溶液(水酸化ナトリウム;NaOHでpH7.5に調整されている)2.2μlを加えて反応を停止し、これを50μlずつ分取して液体窒素で急冷した後、-70℃冷凍庫で保管した。冷凍された小胞体溶液は、使用の前に、30℃で急速解凍して使用した。

【0034】実施例4

天然ホモジネート(細胞初期破砕物)からゴルジ体の分離

実施例2の、冷凍保管された細胞初期破砕物を、30℃で急速解凍した後、氷に置いた。この細胞初期破砕物を4℃、5,000gで15分間遠心分離した。最初の5,000gでの遠心分離後、ほとんどの上清が除去され、ペレットの黄褐色の部分(上部3分の1)が少量の上清内で再懸濁された。よく混ぜた後、この溶液6mlに10mMのトリス-酢酸(pH7.4)を含む2.3Mのスクロース溶液を添加して、全体溶液のスクロース濃度が1.4Mになるようにした。ここにNa₂EDTAの最終濃度が1mMになるように添加した後、よく混ぜて、SW28チューブ(Beckman)に入れた。この混合液を超遠心分離器に入れた。そして、その上を

14mlの10mMトリス-酢酸(pH7.4)を含む1.2Mのスクロース溶液で、8mlの10mMトリス-酢酸(pH7.4)を含む0.8Mのスクロース溶液で、順に満たした後、4℃(Beckman SW28ローター、23,000rpm)で、90,000gで150分間超遠心分離した。0.8M-1.2Mのスクロース溶液の界面における濁った一群(ゴルジ体部分)が、注射器の小さな穴によって、最小限の量(≤1.5ml)得られた。この回収されたゴルジ体の部分を3倍の稀釈緩衝液(55mMのトリス-酢酸、5mMの酢酸マグネシウム(pH7.0))で稀釈した後、4℃、90,000gで45分間超遠心分離した。超遠心分離後得られたゴルジ体の沈殿物を、50-100μlの貯蔵緩衝液(5mMのトリエタノールアミン、2mMのDTTおよび250mMのスクロース)で溶解した。貯蔵緩衝液に溶けさせた後、50μlずつ分取りして液体窒素で急冷して-70℃冷凍庫で保管した。このように冷凍したゴルジ体溶液は使用の前に30℃で急速解凍して使用した。

20 【0035】実施例5

天然ホモジネート(細胞初期破砕物)から分離した細胞膜の製造

実施例2の冷凍保管された細胞初期破砕物を30℃で速く溶けさせた後、氷に置いた。この細胞初期破砕物を4℃、25,000gで30分間遠心分離した。上清を除去して約 5×10^8 の細胞数あたり1mlの0.2M、リン酸カリウム緩衝液(pH7.2)で沈殿物を浮遊させた。この溶液を6.6%のデキストランT500(Pharmacia Biotech)と6.6%(v/v)のポリエチレングリコール3350(Fisher Scientific)の高分子混合液および0.2Mリン酸カリウムを含んだ、2相系(two-phase system)の上に加えた。これを4℃で完全に混ぜた後、4℃、1,150gで5分間遠心分離した。このようにして層が分離されると、細胞膜を多量に含んでいる上層を回収して、1mlの重炭酸で稀釈し、30,000g、15分間で再遠心分離した。遠心分離後、得た細胞膜の沈殿物を50-100μlの貯蔵緩衝液で溶解した。50μlずつ分取し、液体窒素で急冷して、-70℃冷凍庫で保管した。このように保管したゴルジ体溶液は使用の前に30℃で急速解凍して使用した。

【0036】実施例6

翻訳後修飾が導入された転写-翻訳結合無細胞蛋白質生産法によるEPOの生産

翻訳後修飾が導入された転写-翻訳結合無細胞蛋白質生産法によるEPOの生産のために、ヒトEPOの遺伝子を含んでいるベクターのp64T-EPO(Boissel, J. P., et al., J. Biol. Chem. 268:15983-15993 (199

3))を、塩化セシウムを利用する超遠心分離法で精製して、無細胞蛋白質生産の鑄型として使用した。無細胞蛋白質生産の際、糖鎖付加反応関連細胞内マシーナリーを含んでいる翻訳後修飾関連細胞内マシーナリーを添加する。ここで翻訳後修飾関連細胞内マシーナリーとは、実施例3から5において説明した、小胞体とゴルジ体、または、小胞体とゴルジ体と細胞膜の調合を意味する。反応混合物は、ヌクリアーゼで処理した53%の細胞抽出物(RRL)と、その他の基本的な構成成分の最終的な濃度は; 17 mMのクレアチンリン酸、48 μ g/mlのクレアチンフォスフォキナーゼ、40 μ Mの各アミノ酸、260 units/mlのSP6 RNAポリメラーゼ、75 μ g/mlの環型プラスミドDNA、1.8 mMのATP、1.3 mMのGTP、各1 mMのUTPおよびCTP、50 mMの酢酸カリウム、3.6 mMの酢酸マグネシウム、0.4 mMのスペルミジン、4 mMのHepes/KOH (pH 7.3)、1,600 units/mlのリボヌクリアーゼ阻害剤、2.7 mMのDTT、9.5 μ Mのヘミン、57 μ l/mlの子牛肝由来のトータルtRNA混合物、である。以上をよく混ぜた混合液を30°Cで60分間反応して、蛋白質合成と同時に糖鎖付加を誘導した。

【0037】図1には、上述した方法により翻訳後修飾されたEPOと翻訳後修飾されていないEPOを、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法で分離してオートラジオグラフで撮影した写真が示されている。レーン1は、翻訳後修飾マシーナリーの添加のない、無細胞蛋白質生産法で生産したEPOを、レーン2は、翻訳後修飾マシーナリーを添加して糖鎖付加を誘導して生産したEPOを示す。翻訳後修飾関連細胞内のマシーナリーの添加は、生産されたEPOの分子量の増加を誘導し(レーン2)、これは糖鎖付加が起こったことを表す。

【0038】上記の反応後、糖鎖付加反応のために添加したマシーナリーなどの膜成分を溶かすために、0.5%のトリトンX-100を反応液に添加して常温で10分間放置した後、生産されたEPOをEPOと特異的に結合する単一群抗体を利用して一般的な方法で分離した。

【0039】図2は、通常の細胞培養方法によって製造されたEPOと、本発明の無細胞完全翻訳後修飾法によって製造されたEPOのウエスタンブロッティングの結果を示している。レーン1は、通常の細胞培養法で生産されたEPOを、レーン2は、上記の翻訳後修飾が導入された無細胞生産法で生産したEPOを表す。図2から、本発明の方法で生産されたEPOは、従来の細胞培養法で生産されたEPOと同じ分子量であり、また、EPOと特異的に結合する抗体に対し、同様の結合性質を持つことが分かる。

【0040】図3は、糖切断酵素で処理したEPOをオートラジオグラフで撮影した写真が提示されている。つ

まり、図3は、EPOに付加された糖鎖の構造が完全なことを確認するために、糖鎖構造を認識して選択的に切断する、糖切断酵素で処理した結果を示す。レーン1は、翻訳後修飾マシーナリーの添加をせずに生産されたEPOを、レーン2とレーン3は、翻訳後修飾が導入された、無細胞翻訳後修飾蛋白質生産法で生産されたEPOを、レーン4とレーン5は、無細胞翻訳後修飾蛋白質生産法で生産されたEPOを糖切断酵素Fで処理した試料を、レーン6は、無細胞翻訳後修飾蛋白質生産法で生産されたEPOを糖切断酵素Hで処理した試料を示す。報告されたものによると、生物学的活性を持つEPOは、糖鎖構造が複合型である。このような複合型の糖鎖は、糖切断酵素Hでは切られず、糖切断酵素Fで切られると、知られている。図3から、無細胞翻訳後修飾蛋白質生産法で生産されたEPOは、糖切断酵素Hに対する抵抗性を持つが、糖切断酵素Fでは切られるので、完全な複合型の糖鎖構造をもつことが分かる。

【0041】図2と3に示した結果から、本発明の方法による無細胞翻訳後修飾蛋白質生産法で生産されたEPOは、細胞培養法で生産されたEPOと同じ構造を持つと結論付けることができる。

【0042】膜の可溶化のために、反応混合物は、0.5%トリトン(Triton)X-100で処理された。その後、合成されたEPOは、一般的な手法を用いて、EPOのモノクローナル抗体で、免疫的に浄化された(immuno-purified)。

【0043】一方、EPOを含む、分離した溶液を、リフォルディング(refolding)溶液(5.0 mMのリン酸二水素ナトリウム、2% (v/v)のラウリルサルコシン酸ナトリウム、40 μ Mの硫酸銅)に透析してリフォルディング(refolding)させた後、EPOを凍結乾燥した。分離したEPOの生物学的活性は、以下の記載のとおり測定した。

【0044】生産されたEPOのインビトロ活性は、10%の血清を含んでいるRPMI 1640の培地(Kitamura, T. et al., Blood 73:375-380 (1989))で培養した、EPO依存性生長ヒト株細胞TF-1の成長で測定した。

【0045】インビボ活性は、ゴールドワッサーの方法(Goldwasser, E. and Gross, M., Methods in Enzymol. 37:109-121 (1975))によりネズミの血球細胞に導入された 59 Feを定量して測定した。

【0046】各測定値は、平行線分析(parallel line assay)(Dunn, C.D.R., and Napier, J.A.P., Exp. Hematol. (N.Y.) 6:577-584 (1978))により決定した。つまり、1試料あたり9度測定し、各測定あたり2度の分析でインビトロ活性を測定し、インビボ活性の測定のために、1試料あたり

3度の測定と、各測定あたり3匹のマウスを使用した。
1/500に稀釈したEPOの試料に含まれている塩の
ようなほかの物質は、生物学的活性分析に影響しなかつた。

【0047】生物学的活性分析には、第二国際標準基準品(the second international Reference Preparation)により高度に精製された組替えヒトEPO(recombinant human EPO, rHuEPO)を標準品で使用した。生物学的活性の測定の結果、本実施例の転写-翻訳結合無細胞翻訳後修飾蛋白質生産法で生産されたEPOをrHuEPOと比較すると、先に無細胞翻訳後修飾蛋白質生産法で生産したEPOが、細胞培養で生産したEPOの構造と同じであったことから予想できるように、インビトロ活性およびインビボ活性が、実験誤差の範囲内でrHuEPOと類似した。

【0048】実施例7

翻訳後修飾が導入された転写-翻訳非結合無細胞翻訳後修飾蛋白質生産法によるEPOの生産

翻訳後修飾が導入された転写-翻訳結合無細胞翻訳後修飾蛋白質生産法でEPOを生産するために、ヒトEPOの遺伝子(cDNA)を含んでいるベクター(プラスミド)の、p64T-EPOを、塩化セシウムを利用した超遠心分離法で精製して、インビトロ転写反応の鋳型として使用した。この方法では、翻訳反応と分離された、別個の転写反応を遂行する。

【0049】本実施例のインビトロ転写反応に、キャップ構造(7 mG(5')ppp(5')G)をmRNAに導入する方法と導入しない方法を使用した。一般的にキャップ構造を導入したmRNAを鋳型で使した場合のほうが、蛋白質合成反応に必要なmRNAの量が少ない方法を利用した方法に比べて、最終蛋白質合成の面では不利であるが、mRNA生産自体が簡便で、転写反応によるmRNAの生産量もはるかに多い。

【0050】キャップ構造を導入しないインビトロ転写反応の最適条件は以下のとおりである：40 mMのトリス-塩酸(pH 7.5)、6 mMの塩化マグネシウム、10 mMのDTT、1 mMの各核酸(NTP)、1000 units/mlのリボヌクリアーゼ阻害剤、2 mMのスペルミジン、1,000 units/mlのSP6 RNA重合酵素、10 mMの塩化ナトリウムおよび0.1 mg/mlの環型のDNA(プラスミド)。そして、キャップ構造の導入のためのインビトロ転写反応の最適条件は、キャップ構造類似体(cap analog)の添加と使用GTP濃度に差異があるが、以下のとおりである：40 mMのトリス-塩酸(pH 7.5)、6 mMの塩化マグネシウム、10 mMのDTT、各1 mMのATP、CTPおよびUTP、0.5 mMのGTP、1000 units/mlのリボヌクリアーゼ阻害剤、2 mMのスペルミジン、1,000 units/mlのS

P6 RNA重合酵素の塩化ナトリウム、0.5 mMのキャップ構造類似体および0.1 mg/mlの環型DNA(プラスミド)。

【0051】転写反応のために以上の成分を混合するとき、低い温度ではスペルミジンとDNAが共沈するので、これらの間の沈殿物の形成を防止するために、DNA以外のすべての成分を混合した混合液を、37℃であらかじめ温めた後に、DNAを添加した。転写反応は37℃で4時間遂行した。反応後、合成されたmRNAはフェノール/クロロホルム抽出法で反応液から抽出し、この抽出液に同量の5 M塩化リチウム水溶液を加え、氷に1時間放置してmRNAを選択的に沈殿させた。沈殿されたmRNAを回収するために、4℃、5,000 gで15分間遠心分離した後、得られた沈殿物を75%(v/v)のエタノールで洗浄し、RNA分解酵素がない、分子生物学用純度の水に溶かした。

【0052】転写-翻訳非結合無細胞翻訳後修飾蛋白質生産の際に、糖鎖付加反応関連細胞内マシーナリーを含む、翻訳後修飾関連細胞内マシーナリーを添加する。ここで、翻訳後修飾関連細胞内マシーナリーとは、実施例3から5で説明した、小胞体とゴルジ体、または小胞体とゴルジ体と細胞膜の調合物を意味する。

【0053】反応混合物は以下ものを含む：ヌクリアーゼで処理した53%(v/v)の細胞抽出物(RRL)、17 mMのクレアチンリン酸、48 μg/mlのクレアチンフォスフォキナーゼ、40 μMの各アミノ酸、30 μg/mlのmRNA、0.8 mMのATP、0.3 mMのGTP、50 mMの酢酸カリウム、0.5 mMの酢酸マグネシウム、0.4 mMのスペルミジン、4 mMのHepes/KOH(pH 7.3)、1,600 units/mlのリボヌクリアーゼ阻害剤、2.7 mMのDTT、9.5 μMのヘミンおよび57 μg/mlの子牛肝由来全体tRNA混合物である。以上をよく混ぜた混合液を30℃で60分間反応して、蛋白質合成と同時に糖鎖付加を誘導した。

【0054】このように生産したEPOも、実施例6の方法で生産したEPOと同じ構造をもつことが図4から分かる。レーン1は翻訳後修飾関連細胞内マシーナリーの添加なしで、無細胞蛋白質生産法で生産したEPOを、レーン2は翻訳後修飾が導入された転写-翻訳非結合無細胞翻訳後修飾蛋白質生産法で生産したEPOを、レーン3は翻訳後修飾が導入された転写-翻訳結合無細胞翻訳後修飾蛋白質生産法で生産したEPOを示す。つまり、実施例6の図3のレーン3のEPOと本実施例の図4のレーン2のEPOが同じであることが分かる。

【0055】上記の反応後、糖鎖付加反応のために添加した膜成分を溶かすために、0.5%のトリトンX-100を反応液に添加し、常温で10分間放置した後、合成されたEPOをEPOと特異的に結合するモノクローナル抗体を利用して、一般的な方法で分離した。EPO

を含んでいる分離した溶液を、リフォルディング (refolding) 溶液 (50 mM のリン酸二水素ナトリウム、2% (v/v) のラウリルサルコシン酸ナトリウム、40 μ M の硫酸銅) に透析してリフォルディングした後、EPO を凍結乾燥した。

【0056】分離したEPOの生物学的活性は、実施例6と同じ方法で測定した。転写-rHuEPOと比較した結果、実施例6と同じく、インヒトリ活性およびインビボ活性がrHuEPOと類似していた。

【0057】実施例8

無細胞翻訳修飾蛋白質生産法と酵素的糖付加反応を結合した方法によるEPOの生産

実施例6と7に示された、転写-翻訳結合無細胞翻訳後修飾蛋白質生産法および転写-翻訳非結合無細胞翻訳後修飾蛋白質生産法による無細胞翻訳後修飾蛋白質生産反応後、糖鎖付加反応のために添加した膜成分を溶かすために、0.5%のトリトンX-100を反応液に添加し、常温で10分間放置した。この反応液自体またはこれから分離したEPOは、糖置換酵素の一種のトランス-シアリダーゼで糖鎖末端にシアル酸をさらに付加できる。また、糖鎖末端のシアル酸の付加が増大するほど、一般的に糖蛋白質の薬効が増加する。使用したトランス-シアリダーゼは既に報告された方法により得た (Cavallero, R. and Pereira, M. E. A., J. Immunol. 140: 617-625 (1988); Prioli, R. P., et al., J. Immunol. 144: 384-439 (1990))。

【0058】シアル酸の提供者 (donor) には、0.25 μ mol の2,3-シアリルラクトースまたはp-ニトロフェニル- α -N-アセチルノイラミン酸を使用し、無細胞翻訳後修飾蛋白質生産反応液15 μ l に、0.5 μ g/ml のトランス-シアリダーゼ5 μ l を加えた。精製した後、凍結乾燥したEPOの場合は25-50 μ g のEPOを0.25 μ mol の2,3-シアリルラクトースまたはp-ニトロフェニル- α -N-アセチルノイラミン酸が含まれた40 μ l のカコシル酸/塩酸緩衝液 (pH 6.9) に溶かした後、ここに0.5 μ g/ml のトランス-シアリダーゼ10 μ l を加えた。このように反応液を準備して、30°Cで18時間酵素処理した後、実施例6に使用したモノクローナル抗体を利用した分離法で、シアル酸がさらに付加されたEPOを分離した。

【0059】分離したEPOの糖鎖末端シアル酸の付加の程度を調査するために、既に開示されているメチル化分析法 (Scudder, P., et al., Eur. J. Biochem. 168: 585-593

(1987)) により分析し、生物学的活性は、実施例6に提示された方法に従った。誘導化されたサンプルは、0.25 mm \times 30-m 融合 (fused) シリカ DB5 キャピラリーカラム (J&W Scientific) で準備された、ヒューレット パッカード社の5890A キャピラリー ガス クロマトグラフィーで分析された。そこでは、5分の保持時間の後、2°C/分のレートで、150°Cから230°Cに温度上昇 (ramped) された。トランス-シアリダーゼで処理したEPOは、シアル酸の含量が10%増加し、生物学的活性も15%増加した。つまり、平均EPO 1 mol 当たり、シアル酸が11.9 mol から13 mol に増加した。

【0060】上記から、本発明は、効率的な矛盾の無い、無細胞完全翻訳後修飾蛋白質生産法を提供することが証明された。また、本発明はここに記載された特定の方法、示された方法および混合物の特定の使用のどれにも限定されるものではない。前述の開示の権利において、本発明分野の当業者は、その精神および観点から離れること無しに、本発明の実行において、代用、交換または修正が可能であることは明らかであろう。

【0061】

【発明の効果】以上のとおり、本発明は、無細胞蛋白質生産と無細胞完全翻訳後修飾とを組み合わせた完全翻訳後修飾蛋白質の生産方法を提供するものである。そのため、従来の無細胞蛋白質生産法では、部分的に翻訳後修飾された蛋白質のみしか製造できなかったのに対し、本発明では、翻訳後修飾のマシーナリーを採用することによって完全翻訳後修飾蛋白質が生産できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明の方法により翻訳後修飾されたエリスロポエチン (erythropoietin; EPO) と翻訳後修飾されていないEPOをSDS-ポリアクリルアミド電気泳動法で分離してオートラジオグラムで撮影した写真である。

【図2】図2は、通常の細胞培養法で生産したEPOと本発明の方法により翻訳後修飾が導入された無細胞生産法で生産したEPOのウェスタンブロットング (western blotting) の結果である。

【図3】図3は、糖切断酵素で処理したEPOをオートラジオグラムで撮影した写真である。

【図4】図4は、翻訳後修飾が導入された転写-翻訳非結合無細胞蛋白質生産法で生産したEPOと翻訳後修飾が導入された転写-翻訳結合無細胞蛋白質生産法で生産したEPOをオートラジオグラムで撮影した写真である。

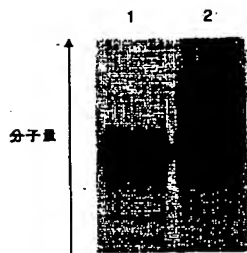
10

20

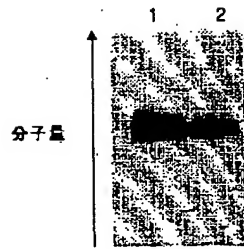
30

40

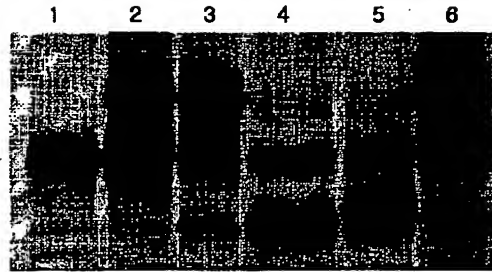
【図1】



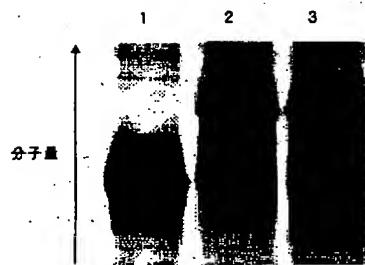
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

- (72)発明者 サン ヒョン カン
大韓民国、ソウル、ガナクグ、ボンチョ
ン 8ードン、1536-2
- (72)発明者 テク ジン カン
大韓民国、ソウル、ガナクグ、シリム
ドン、415-19
- (72)発明者 ジ ヒョン ウー
大韓民国、インチョン、プビョング、プ
ガエ 2ードン、106-37

- (72)発明者 サン キル リー
大韓民国、ソウル、ソチョグ、バンボボ
ンードン、バンボ アパート、20-109
- (72)発明者 スン ウー チョ
大韓民国、ソウル、マボグ、ソギョード
ン、347-13

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA36 DA44 FB01 FB03
FB05 FB09
4B024 AA20 BA21 CA04 CA12 HA01
HA03 HA06 HA15
4B064 AG18 CA21 CC24 CD21 DA01

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.